

学 位 論 文 要 旨

カイコガ SOD による酸化ストレス調節を介した蛹化誘導機構に関する研究
Study on the mechanism for initiation of pupation through the control of oxidative stress
with Superoxide dismutase in silkworm *Bombyx mori*

生物生産科学専攻 生物制御科学大講座
野島 陽水

昆虫は様々なストレスに対して種独特の生体保護システムを巧みに利用し、環境の変化に素早く対応する。昆虫が環境から受けるストレス因子には、外気温、紫外線、農薬などの化学物質、病原微生物の感染、乾燥や飢餓がある。また、完全変態昆虫は蛹の時期に劇的な変化を遂げ、ここでも強いストレス負荷が伴うことが知られている。これらのストレス下では個体内において核酸やタンパク質に障害を与える活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) が発生し、過剰の ROS が発生すると細胞内が酸化ストレスと呼ばれる状態となる。従って、昆虫は環境からの刺激や蛹化に伴う刺激により常に酸化ストレスに晒されているが、その処理機構や生理機能については不明であった。

一方、ROS の処理を担う Superoxide dismutase (SOD) は主要な抗酸化タンパク質であり、そのシステムの中核を担う。SOD には、細胞質に局在する SOD1 とミトコンドリアに局在する SOD2 があり、*Drosophila* では SOD1 または SOD2 が機能を喪失すると短命になると共に、ストレス負荷に対して脆弱となることが報告されている。一方で、カイコガ (*Bombyx mori*) ではこれまでにカイコガ SOD1 (BmSOD1) および SOD2 (BmSOD2) 遺伝子の存在と各組織における mRNA 発現が報告されていたが、生体内において実際に機能する BmSOD1 および BmSOD2 タンパク質の各組織における特性やその役割については研究されていなかった。

そこで本研究では、全ゲノムが解読され組織や発育段階での解析が容易に行えるカイコガを用いて、抗酸化能を持つと予測される BmSOD1 および BmSOD2 タンパク質の生体内における役割を解明し、ROS の処理機構および蛹化における生理機能を明らかにすることを目的とした。

最初に、BmSOD1 および BmSOD2 タンパク質の組織や発育段階における特性を解析し

たところ、ROS に関連すると考えられる組織や発育段階において高発現していた。次いで、BmSOD1 および BmSOD2 タンパク質の環境からのストレス刺激に対する応答能について検討した。その結果、幼虫個体への紫外線照射や細菌成分の接種により、BmSOD1 および BmSOD2 の mRNA またはタンパク質の発現量が脂肪体において増加し、これらの刺激に対し応答することが明らかになった。一方で、農薬であるロテノンに対しては応答しなかった。したがって、カイコガはストレスの種類により抗酸化タンパク質を使い分けている可能性が推定された。

続いて、カイコガ幼虫への紫外線照射に応答する細胞内分子ネットワークをマイクロアレイおよびパスウェイ解析にて検討したところ、エクダイソンや JH により誘導される遺伝子と同一の遺伝子群を見出した。そこで、エクダイソンと JH 応答遺伝子の発現について qRT-PCR で検討したところ、エクダイソン応答遺伝子の mRNA 発現が紫外線照射量依存的に上昇することを確認した。このことから、紫外線照射とエクダイソンによる脂肪体の遺伝子発現応答が類似する可能性が示唆された。

次に、BmSOD1 および BmSOD2 タンパク質の蛹化における役割に着目し、蛹化における ROS の挙動について解析した。その結果、前蛹期において体液中のエクジステロイド濃度が上昇すると、脂肪体において ROS の蓄積量も増加することが明らかになった。一方でこの時期には、BmSOD1 および BmSOD2 タンパク質はカイコガ脂肪体において発現が低下し、更に BmSOD2 と結合し協調的に機能する抗酸化タンパク質の BmHsp60 も発現低下した。従って、カイコガ脂肪体では体液中のエクジステロイド濃度の上昇により、これらの抗酸化タンパク質の発現が低下することで細胞内において ROS が積極的に蓄積されることが示唆された。

更に、蛹化における ROS の生理機能を解析するため、4 齢眠期および前蛹期の脂肪体で発現が上昇する遺伝子をマイクロアレイデータにより探索したところ、プログラム細胞死や ROS の除去に関与する遺伝子が同定された。また、これらの遺伝子発現を調節すると予測される miRNA の存在も示唆された。

以上の結果、カイコガは脱皮や蛹化の誘導時に、エクジステロイドの体液中濃度の上昇に伴い BmSOD1, BmSOD2, BmHsp60 タンパク質など抗酸化タンパク質の発現を低下させ、脂肪体において ROS を蓄積させることが明らかとなった。蓄積された ROS はプログラム細胞死を誘導し組織の再編成に向かわせるが、過剰に蓄積された ROS を速やかに無毒化するため同時に ROS を除去する遺伝子を活性化すること、更にこれらの機構には miRNA が関与することが推定された。

本研究では、抗酸化タンパク質 BmSOD1 および BmSOD2 タンパク質の機能とその役割について検討した。その結果、外部刺激の紫外線と内部刺激の蛹化の両面でストレスを処理するシステムは共通して BmSOD1 および BmSOD2 が制御することを初めて明らかにした。また、生体内で発生した ROS は蛹化誘導のスイッチとしても機能し、ROS が蛹化システムの一部として組み込まれていることが明らかとなった。